

18. Bodar, E.J., *et al.* On-demand anakinra treatment is effective in mevalonate kinase deficiency. *Ann Rheum Dis* (2011). 文献添付

高 IgD 症候群におけるアナキンラ投与による治療の説明

本書は、あなた（ ）が受ける治療法についてあなたにその内容等を説明するものです。

あなたは、この治療法に含まれる利益と危険について十分に理解された上で、これを受けるかどうか決めてください。これは、インフォームドコンセントと呼ばれる手続きです。本書には、あなたがわかりやすく説明するために、この治療法に関する詳しい情報が記載されています。もしわかりにくい点があれば、どうぞ遠慮なく担当医にお尋ねください。この治療について十分ご理解の上、これを受ける意思があるならば、添付してある依頼書に署名捺印をしてください。

1. アナキンラによる治療について

関節炎、新生児期からの発熱、持続する炎症反応等の症状より高 IgD 症候群が疑われ、尿中のメバロン酸を測定すると著明高値であり、また高 IgD 症候群の責任遺伝子 MVK の遺伝子解析を行ったところこれまで報告のある遺伝子異常が見つかり、高 IgD 症候群であることが判明しました。また同遺伝子の酵素活性を測定したところ、低下しており同診断が間違いないことを確認しております。

近年、高 IgD 症候群の病態として炎症を引き起こす IL-1 β が過剰産生されることが報告されています。そしてその IL-1 β を中和する生理的なタンパク質 IL-1RA（アナキンラ、商標名キネレット）を投与しその臨床症状及び検査所見の改善（発熱、発疹、炎症反応等）が見られたことが報告されています。現在の患者さんの状態は、プレドニゾロン 10 mg 連日内服等により治療しておりますが、炎症もしくは副腎皮質ホルモン投与による著明な発育障害、関節炎、関節可動域の減少、検査所見上炎症所見の高値が持続しております。今回発育障害及び関節破壊への進行及び慢性炎症によるアミロイドーシスに対する治療目的で、近年高 IgD 症候群に対して効果が報告されているアナキンラの投与を行いたいとかがえております。

2. 方法

日本では未承認で販売されていないアナキンラ（商標名キネレット、製造元 SOBI）を入手するため、RHC USA Corporation 日本支社に輸入代行を依頼、輸入致します。患者さんの体重あたり必要な薬剤量にするため、1 アンプル 100 mg から、1 週間分に相当する 14 mg/kg (約 240 mg, 1.6 ml) へ、当院薬剤部にて無菌的にガラスバイアルに分注します。さらにガラスバイアルからインシュリンシリンジを用いて、2 mg/kg (約 34 mg, 0.23 ml) を採取して皮下注射致します。

そして現在投与中の内服薬はそのまま減量することなく、アナキンラを投与し始めます。効果の判定基準として CBC, CRP, 血沈, SAA を 1-4 週に 1 回以上検査し、炎症反応の低下を検討するとともに、臨床症状として関節の腫脹、疼痛の変化を関節点数として記録致します。中枢神経系の評価として、治療前後で頭部 MRI, 発達テスト、脳波の検討を行います。

効果判定および感染症等の副作用を調べるため、はじめの 3 週間は入院治療とし、その後半年は 2 - 4 週間に 1 回、その後は 1 か月に 1 度の外来受診とします。また連日皮下注射を行うため、入院中に

自己注射の仕方を習得して頂きます。なお、効果判定および副作用をモニターしながら、効果が不十分であれば、アナキンラを 10mg/kg (170mg, 1.13ml) まで増量する可能性があります。

3. 毒性、副作用

アナキンラの治療をこれまでの内服薬と同時投与する形で開始する予定です。患者さんの場合は、免疫抑制剤としてプレドニンをすでに内服中であり、アナキンラの投与によりさらに免疫抑制がかかる危険性があります。具体的には、各種感染症に罹患する危険性が増加致します。そのため、対応策として治療開始 3 週間は入院治療として、厳重な監視下（医師の診察、血液検査等）に感染症の有無に最大限の注意を払いながら治療を行い、効果が見られればプレドニンを減量する予定です。特に合併症として間質性肺炎がこれまで見られており、理学所見、SpO₂、胸部 CT 等により嚴重に増悪がないか検討します。他のアナキンラ投与の合併症としては、注射部位反応、感染症、好中球減少症があり、その他頻度は多くないものの頭痛、吐き気、下痢が報告されています。上記合併症の発現を臨床症状の注意深い観察、血液検査（血算、血液生化学、CRP 等）の定期的な施行（入院中は 1 週間に 1 度以上、退院後半年は 2-4 週間に 1 度、その後は 1 か月に 1 度）により早期発見につとめ、発現時は投与を中止し、直ちに副作用に応じた治療を開始致します。なおその健康被害が生じた場合の補償は一般診療での対処に準じて行うこととします。

4. 費用について

アナキンラは現在のところ、日本では高 IgD 症候群の治療薬として国内では認められていません。このため、この薬剤にかかる費用については保険で賄うことができません。費用は 1 日分 2 mg/kg 約 34 mg が 1400 円程度であり、1 日 34 mg 使用するとして月額約 42000 円、またアナキンラを分注するバイアル代として月額約 2400 円が必要となります。病状や効果によっては、1 日 10 mg/kg 約 170 mg に増量する可能性もありますが、この費用をどこで負担するか、という問題があります。先日の話し合いの結果より、この費用は患者さん及びそのご家族にご負担頂くことでご理解下さい。

5. その他

もしあなたが、本治療を望まれない場合でも、あなたは今までと同様に、継続して京都大学医学部附属病院で治療を受けることができます。また、もし本治療を受けることに承諾された後でも、いつでもその承諾の意思を変更することは可能で、変更後も今までどおりの治療は続けていきますのであなたの不利益になることはありません。

また高 IgD 症候群におけるアナキンラ治療に得られた情報は特にその副作用・有効性は大変貴重であり、患者さんの個人情報かわからないようにして、学会・論文等で報告する可能性があります。

アナキンラ治療同意書

京都大学医学部附属病院長殿

患者氏名： _____

私はアナキンラ治療について別紙の説明を読み、また口頭で十分な説明を受け、その利益と危険性についても十分理解しました。また、これらについて十分に質問をする機会もありました。私は、この治療に対する同意と依頼をいつでも撤回でき、その場合でも、貴院において通常受けることのできる治療が制限されないことを理解しています。

私は、貴院において行われる上記の治療に同意し、その実施を貴院に依頼します。

平成 年 月 日

本人住所 _____

氏名 _____ 印

代諾者住所 _____

氏名 _____ 印

患者との続柄 ()

平成 年 月 日

説明医師 _____ 印

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群由来ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成に関する研究

研究分担者：中畑 龍俊

（京都大学 iPS 細胞研究所教授）

研究要旨

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その多彩な臨床症状は、コレステロール代謝に関与する MK の異常により、Small GTPase のゲラニルゲラニル化修飾異常が起こり、最終的に IL-1 β 産生が亢進し炎症を惹起すると推測されているが、その詳細な機序は未だ明らかにされていない。本研究は、高 IgD 症候群の患者さん由来の iPS 細胞を作成し、より詳細な病態解析を行い、治療基盤開発のための研究を進展させることを目的に行われた。

本年度、京都大学医の倫理委員会により承認された研究計画に従い、高 IgD 症候群ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成のための研究を進めた。

高 IgD 症候群の 5 名の患者からインフォームドコンセントを取得し、皮膚生検により皮膚組織を頂いた。皮膚組織は細片化後、10%FCS 存在下 DMEM 中で 3 週間培養し、トリプシン処理により増殖した細胞を回収し、洗浄後、新たな 4 枚のシャーレに播種し培養する。このような培養を繰り返すことにより、十分な量の線維芽細胞のストックを作成した。

作成された線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて 3 あるいは 4 遺伝子（Oct3/4、Sox2、Klf4、±c-Myc/L-Myc）を導入することにより高 IgD 症候群患者由来 iPS 細胞の作成を試み、いずれの患者からも複数の iPS 細胞クローンの樹立に成功した。今後、樹立された患者由来 iPS 細胞から単球、マクロファージに分化させ、これらの細胞を用いて IL-1 β の産生などを検討し、高 IgD 症候群の病態解明、治療基盤開発を行う予定である。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ (MK) 機能喪失という代謝性疾患の性格を有する疾患であり、遷延する炎症性疾患で、発熱、関節炎に留まるものから、発育不全、精神発達遅延等の重度の障害に至るものまで、多様性を持つ疾患である。

しかし、病態解析という観点では、MK はコレステロール代謝に関与し、同症候群では Small GTPase のゲラニルゲラニル化修飾異常が起こり、最終的に IL-1 β 産生が亢進し炎症を惹起すると推測されているが、その詳細な機序は未だ明らかにされていない。また治療においては一部の症例にスタチン製剤が有効であるが、重症例では無効で抗 IL-1 β 療法等の生物製剤を含めた病態に基づく治療法の開発が望まれている。

このように、高 IgD 症候群の病態においては不明の部分が多いため、疾患の有効な治療法が確立されず、患者さんに恩恵が還元できない状況にある。これを解決すべく、高 IgD 症候群特異的 iPS 細胞の作成・解析を通して、病態の解明、治療基盤の開発を行う。

B. 研究方法

高IgD症候群患者よりiPS細胞を作成する。京都大学医の倫理委員会により認められた「ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析の関する研究」の研究計画に従って研究を開始した。

iPS細胞研究所中畑研究室を中心として、同山中研究室の技術供与を受けながら疾患特異的iPS細胞の樹立を行うこととした。

MK遺伝子の発現は、血球、非血球系細胞両者に見られるが、骨髄移植を受けた患者においては血球系細胞を正常化することにより寛解が得られており、血球系細胞が臨床症状発現と密接に関係している。従って、骨髄移植を受けた患者においても、iPS細胞を用いた病態再現が可能とするためには非血液系細胞からiPS細胞を樹立し、その細胞から血球を分化させそれを用いた解析が必須と考えられる。そのため、iPS細胞は患者皮膚生検で得られた線維芽細胞から樹立することとした。樹立された患者由来iPS細胞から単球、マクロファージに分化させ、これらの細胞を用いてIL-1 β の産生などを検討し、病態解明、治療基盤開発を行う。なおわれわれは既に健常人iPS細胞から単球・マクロファージ系への分化は確認できている。患者由来iPS細胞を補完する形で、患者由来末梢血、線維芽細胞を用いた病態の解明も同時進行で進める。

高IgD症候群の病態を解明する上で、生体での評価は欠かせない。我々が開発してきたヒト細胞の生着を許容する免疫不全マウスであるNOD/SCID/c γ nullマウス (NOGマウス) に上記細胞を移植して疾患モデルマウスを作成し、病態解析および治療基盤開発研究を行う。

C. 研究結果

高 IgD 症候群の 5 名の患者からインフォームドコンセントを取得した。皮膚生検により皮膚組織を頂いた。採取された組織に関する個人情報、連結可能匿名化された。生検で得られた皮膚組織は 6 cm のプラスチックシャーレ中で細片化し

た後、10%FCS 存在下、DMEM 中で培養した。培養3週間後、トリプシン処理により増殖した細胞を回収し、洗浄後、新たな4枚のシャーレに播種し培養した。

このような培養を繰り返すことにより、十分な量の線維芽細胞のストックを作成した。

作成された線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて3あるいは4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、±c-Myc/L-Myc)を導入することによりiPS細胞の作成を試みた。当研究室ではすでに、他のいくつかの疾患に関して、ヒト疾患特異的iPS細胞作成が成功していたことから、さまざまな問題点を解決することにより、5名の高IgD症候群患者から複数のiPS細胞クローンの樹立に成功した。

D. 考察

我々は現在までに、上記の方法により血液疾患、免疫疾患、筋肉疾患に対してiPS細胞を作成してきた。多くの疾患では健常人における場合と同様に作成可能であることを確認しているが、通常の方法ではiPS細胞が樹立できない疾患も存在することが明らかとなってきた。今までに得られたこれらの情報を参考にし、高IgD症候群患者由来iPS細胞作成の樹立を試み、5名の高IgD症候群患者いずれからも複数のiPS細胞クローンを樹立することに成功した。

今後、これらの高IgD症候群患者由来iPS細胞がiPS細胞としての品質(未熟性、分化能等)に関して、健常人由来iPS細胞と比較検討するとともに、患者病態を解析するための評価システムを構築して

いく予定である。

E. 結論

5名の高IgD症候群の患者さんから同意を頂き、皮膚線維芽細胞のストックを作成した。3(4)因子を用いた高IgD症候群患者由来iPS細胞の作成を試み、いずれの患者からも複数のiPS細胞クローンを樹立した。今後、樹立された患者由来iPS細胞から単球、マクロファージに分化させ、これらの細胞を用いてIL-1 β の産生などを検討し、高IgD症候群の病態解明、治療基盤開発を行う予定である。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5):1283-1291, 2011.
2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
3. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study

- Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
4. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
 5. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011.
 6. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS ONE* 6(7):e22261, 2011.
 7. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
 8. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Akseptijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632, 2011.
 9. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52 (12) :1743-1749, 2011.
 10. 中畑龍俊: 再生医療の進歩 (II 再生医療の進歩). *小児科診療* 75(1) :57-63, 2012.
- ## 2) 学会発表
1. 中畑龍俊: 特別講演: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 60 回日本医学検査学会 2011 年 6 月 5 日 東京国際フォーラム
 2. 中畑龍俊: 特別講演: 小児疾患における iPS 細胞の応用. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 2011 年 11 月 25~27 日 (25 日) ベイシア文化ホール (前橋市)
 3. 中畑龍俊: 教育講演: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 9 月 17-18 日 (18 日) 東京国際展示場
 4. 中畑龍俊, 伊藤守: 再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第 57 回日本実験動物学会総会 シンポジウム 3 (テーマ: 再生医療の幕を開く動物実験) 2011. 5. 14, 京都テルサ
 5. Tatsutoshi Nakahata: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. (Keynote Lecture) 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research., 2011 年 10 月 1-2 日 (1 日) Taipei Medical University (Taiwan).
 6. 粟屋智就, 加藤竹雄, 柴田実, 中畑龍俊, 平家俊男: ヒト ES/iPS 細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用. 第 114

回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日(13日)(口演) グランドプリンスホテル新高輪(東京)

7. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、阿部純也、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男：Langhans型巨細胞の形成にはCD40-CD40Lシグナルが必須である。第114回日本小児科学会学術集会2011年8月12-14日(13日)(ポスター) グランドプリンスホテル新高輪(東京)
8. Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidetoshi Sakai, Ryuta Nishikomori, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日(15日) 名古屋国際会議場

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群確定診断のためのメバロン酸キナーゼ活性測定系開発に関する研究

研究分担者：西小森 隆太

京都大学大学院医学研究科発達小児科学准教授

研究要旨

高 IgD 症候群は常染色体劣性遺伝性疾患でメバロン酸キナーゼ遺伝子が責任遺伝子であるが、本邦において 2009 年初めて報告された。欧米より報告がかなり遅れた一因は、これまで有効な診断法が整備されていなかった事である。本研究では新規変異が責任病態であると確定する機能評価系としてのメバロン酸キナーゼ活性測定系の確立を目指した。

遺伝子診断で診断が確定した高 IgD 症候群症例、高 IgD 症候群キャリア症例、健康成人においてメバロン酸キナーゼ活性測定系の validation を行ったところ、それぞれの群において、活性値は有為に差を認めた。さらに各群間でオーバーラップはなく、メバロン酸キナーゼ活性測定が高 IgD 症候群診断に有用であることを証明した。

この系を展開し、乳児期発症の周期熱症候群をして知られている PFAPA (periodic Fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis) と診断されている症例において、軽症型の高 IgD 症候群の存在の有無について、メバロン酸キナーゼ活性測定と遺伝子検査を用いて検討した。現在までに 19 症例について検討を行ったが、高 IgD 症候群と診断される症例は見い出せなかった。

A. 研究目的

高 IgD 症候群は、自己炎症性疾患に属し、常染色体劣性遺伝疾患で、その責任遺伝子はメバロン酸キナーゼである。自己炎症性疾患という概念が一般に受け入れられるようになってまだ5年であり、必ずしも高値の IgD 値を伴わない高 IgD 症候群の診断において、未確立の部分が多かった。

高 IgD 症候群の診断においては、より特異度の高いメバロン酸キナーゼ酵素活性の測定、尿中メバロン酸の測定、メバロン酸キナーゼ遺伝子解析が重要である。特にメバロン酸キナーゼ酵素活性はより特異度が高く、また未報告メバロン酸キナーゼ遺伝子異常を発見した場合の機能解析系として重要である。従来本邦ではメバロン酸キナーゼ活性を測定できる施設はなく、オランダまで検体を輸送して依頼しているのが現状であったが、平成22年度の本研究において、メバロン酸キナーゼ活性測定系の確立を行い、本邦における高 IgD 症候群の診断系の確立を行った。平成23年度においてはそのシステムを展開し、乳児期発症の周期熱症候群である PFAPA 症例において、高 IgD 症候群の混在の有無について検討した。

B. 研究方法

高 IgD 症候群疑い患者及び正常健康人から当大学倫理委員会に認められた informed consent を取得し、末梢血の採取を行った。

各患者もしくは健康成人より得られた末梢血よりPBMCを分離して、PHA刺激によりT細胞株を作成した。PHAによるT細胞株を用いる利点としては、(1)細胞融解で得られる蛋白に赤血球数由来の蛋白が混入するのを防ぐことが可能で、より正確な活性を測定

可能である、(2)PHA刺激により保存に比較的強いT細胞を活性化するため、末梢血単核球の採血後の経過時間や保存状態の活性に与える影響を最小限にできる、などが挙げられる。

PHA刺激により作成したT細胞株を遠心して細胞ペレットとし、凍結融解を繰り返すことにより細胞溶解液とした。得られた細胞溶解液の蛋白濃度を測定し、細胞融解液の蛋白として5 μ gを一条件として測定した。3H-メバロノラクトンはアルカリ化によりメバロン酸に変化させ、ATPとバッファーと合わせてタンパクと37°Cで25分間反応させた。反応した混合物をブタノール：水：ギ酸=77:13:10の吸着バッファーにより、TLCプレート上で薄層クロマトグラフィーを行い、リン酸化メバロン酸とメバロン酸とを分離した。分離したそれぞれの分画を液体シンチレーションカウンターで測定し、毎分単位蛋白量あたりのメバロン酸のリン酸化を算出し、メバロン酸キナーゼ酵素活性とした。

C. 研究結果

平成23年度においては、乳児期より周期性発熱を呈し、暫定的に PFAPA と診断された19症例において、高 IgD 症候群に対する検討を行った。19症例中、依頼に基づいて MVK 酵素活性測定をおこなったものが12例、同じく依頼に基づいて MVK 遺伝子検索を行ったものが12症例であった。

従来の研究において、健康人50名よりPHA芽球を分化させ測定を行ったところ、 376.6 ± 115.0 pmol/min/mg という数値を得られ、既に確定している高 IgD 症候群患者 (N=5) では 6.5 ± 3.9 pmol/min/mg であった。

今回、暫定的に PFAPA と診断された症例においては、MVK 酵素活性または MVL 遺伝子変異を認める症例は見い出せなかった。今後も、引き続き、乳児期より周期性発熱を呈する症例において、検討を継続する。

D. 考察

我々の研究において、本邦において高 IgD 症候群と診断された症例は 6 例に留まる。

世界的にみても、高 IgD 症候群の患者数は、200 名～400 名と記載している報告もあるが、十分には把握されていないという現状にある。また、炎症が持続することにより IgD 値が上昇することが知られており、疾患名として高 IgD 症候群は必ずしも病態を反映する名称ではない。そのため、高 IgD 症候群ではないものが高 IgD 症候群と診断されている事例も散見される。一方、病初期においては必ずしも高 IgD 値を示さず、高 IgD 症候群のスクリーニングから逸脱してしまっていた症例も存在した。そのため、高 IgD 症候群という疾患名が、多くの臨床医に対して疾患把握を困難にしており、病態基盤を基にした Mevalonate kinase Associated Periodic fever Syndrome (MAPS) という疾患名への改変を提起するものである。

このような視点に立ち、乳児期より周期性発熱を呈する PFAPA 症例において、高 IgD 症候群 (HIDS、MAPS) の混在について検討した。現在までに 19 症例について検討したが、MVK 活性の低下、MVK 遺伝子の変異は見い出せなかった。

世界的に見ても非常に希少な疾患であり、疾患の全体把握という観点からも、今後も継続して検討を行っていく。

E. 結論

高 IgD 症候群の確定診断法として、メバロン酸キナーゼ活性測定系を確立した。同測定法により、PFAPA 症例における高 IgD 症候群 (HIDS、MAPS) の混在について検討したが、検討した 19 例においては、高 IgD 症候群 (HIDS、MAPS) 症例は存在しなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : The CD40-CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation. *Int Immunol.* 2012;24(5-15)

Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: Results of an international multicenter collaborative study *Arthritis Rheum.* 2011; 63(3625-3632)

Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T : Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood.* 2011 : 118(1225-1230)

Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, Nishikomori R, Heike T : Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. J Pediatr. 2011 : 158(155-159)

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J : Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. Mod Rheumatol. 2011 : 21(641-645)

2. 学会発表

井澤和司、西小森隆太、阿部純也、酒井秀政、谷風尚子、村田祐樹、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、平城徹、平城直子、大嶋勇成 : 寒冷刺激による発熱と凍瘡を認めた Aicardi-Goutieres syndrome の 1 例. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011.

井澤和司、西小森隆太、阿部純也、酒井秀政、谷風尚子、村田祐樹、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、平城徹、平城直子、大嶋勇成 : 寒冷刺激による発熱と凍瘡を契機に診断に至った、TREX1 変異を伴う Aicardi-Goutieres syndrome の 1 例とその 1 家系. 第 4 回日本免疫不全症研究会 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群の遺伝子診断に関する研究

研究分担者：小原 收

（かずさ DNA 研究所副所長）

研究要旨

高 IgD 症候群は、多くの臨床家において、未知の疾患である。本疾患に対する診療体系を確立するためには、その診断方法を確立し、治療基盤を提示する必要がある。しかし、日本における現状は、未だ確定診断方法すら存在しえない状況である。そのため、一般臨床家においては、周期性発熱疾患として、高 IgD 症候群が念頭に入っていない状況である。

高 IgD 症候群の原因はメバロン酸キナーゼ（MK）活性低下であるが、欧米において報告されているようにメバロン酸キナーゼ(MVK)遺伝子の変異を同定することが現時点では最も確実な確定診断につながる方策である。しかし、我々の遺伝子解析データの蓄積からは、疑い症例の中に MVK 遺伝子変異が見出される割合は極めて低いことが分かった。そこで、次世代シーケンサーを用いた迅速アンプリコンシーケンスのプロトコールを新しく開発し、こうした除外診断としての意味が結果的に大きくなる可能性の高い遺伝子解析を低コストで実現することを目指した。今年度は、新しく開発した Multiplex PCR 法によるプロトコールの実証実験として、自己炎症疾患原因遺伝子（NLRP3, 14 PCR 断片）を例にとってその有用性を確認することができた。

A. 研究目的

自己炎症性症候群の概念が提唱されるようになり、やっと10年が経過したばかりである。いわんや高IgD症候群は、多くの臨床医にとって、血清IgDの高い疾患として理解されているのが現実である。しかしながら、京大グループにより、大多数の日本人の高IgD症候群の血清IgD値は、正常範囲内に留まることが明らかにされた。

このような背景もあり、我国の高IgD症候群に対する診療体系は、混乱を極めている。これを解決するために、現在、オランダの研究所にメバロン酸キナーゼ活性測定を依頼するケースが多い。しかし、これは煩雑であり、費用もかかるため、疑い症例すべてにおいて行える検査ではない。

このような背景のもと、現在行える現実的な確定診断方法は、メバロン酸キナーゼ遺伝子変異を同定し、欧米での報告例と対比することにより診断する方法である。このため、周期性発熱をきたし、診断に苦慮する患者さんに対して、高IgD症候群を含む自己炎症性疾患に対する遺伝子診断を行うとともに、遺伝子解析データの蓄積から新たな診断方法の創出を目指す。

B. 研究方法

遺伝子解析は、末梢血からゲノムDNAを抽出し、高IgD症候群の原因遺伝子であるMVK遺伝子のエクソン2からエクソン11までのコード領域すべて（エクソン1は非コード領域である）と、エクソン-イントロン・ジャンクション部位のシーケ

ンスを行った。解析結果はヒトゲノムリファレンス配列におけるMVK遺伝子配列と比較し、理研で開発されたMutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation>)を用いて見出された配列変化のアノテーションを行った。さらに、次世代シーケンサーによる複数臨床検体のプロトコールを新たに開発し、10以上のPCR増幅産物（以下、アンプリコンと略）を1チューブで増幅する方法の有用性を検証した。アンプリコンの次世代シーケンシングには、ロッシュGS FLXチタニウムシステムもしくはGS Juniorシステムを用いて解析した。

C. 研究結果

昨年来京都大学からの検体を中心にMVK遺伝子の構造解析を行ってきたが、並行して、かずさDNA研究所では厚労省難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」における調査研究班の多施設共同研究としても広く免疫不全症の遺伝的原因の解析を進めている。今年度は京都大学以外からも16件の検査依頼を受け付けたが、やはりその結果も含めて眺めても、MVK疑い臨床例に実際に病因と考えられる変異が見出される頻度は多くても1%程度でしかないと確認された。この結果は、MVK遺伝子に原因変異があるかどうかを確定診断に用いるためには、従来のPCR法とキャピラリーシーケンシング技術に依存した方法では効率が悪すぎることを示している。そこで、多数の臨床検体の遺伝子解析を同時並行で進められるように、昨年度にはPCR法で調製したアンプリコンを迅速

にロッシュ次世代シーケンサーで解析可能とするプロトコールを作成した。しかし、多数のアンプリコンをそれぞれ PCR 増幅し、更にその濃度を合わせてシーケンスサンプルにする作業の労力が膨大であり、実際の遺伝子検査法とするには現実的な問題が残されていた。その解消を目指して、以前に我々の研究所が報告した *TthRecA* を用いた Multiplex PCR 法 (Nucl. Acids Res. 2005, vol. 33, e126) をアンプリコンシーケンシングの鋳型調製に用いることによって、自己炎症疾患の原因遺伝子の一つである NLRP3 遺伝子のシーケンシングに必要な 14 アンプリコンが 1 チューブの PCR 反応で調製でき、次世代シーケンサーで全アンプリコンの配列が読み取れることを見出した。

D. 考察

これまでの研究から、我国において、欧米で理解されている表現型とは異なる様式で高 IgD 症候群が診断不明のまま潜在、もしくは他の疾患群として診断・加療されている可能性が考えられてきた。

我国における高 IgD 症候群の正確な診断のためは、今後も臨床症状の可能性を広く捉えて遺伝子解析を続行すべきであり、今回の次世代シーケンサーを用いた解析基盤によって、まず MVK 遺伝子変異の除外診断が迅速に可能になったことは、我国において高頻度で高 IgD 症候群の遺伝的原因となっている他の要因を検索するための重要な基盤と与えるものと考えられる。

E. 結論

高 IgD 症候群の確定診断のためには、MVK 遺伝子の全コード領域の配列解析が現時点では最も確実な手段である。今回の研究によって、近年進歩の著しい次世代シーケンシング技術を導入することで、簡便な臨床検体のマルチプレックス解析が可能であることを示した。これらの基盤は、今後の MVK 遺伝子解析の迅速化と省力化に大きな貢献をすることは間違いなく、MVK 遺伝子変異の有無を迅速に明らかにすることを可能とした。この除外診断の実現は、高 IgD 症候群を含む自己炎症性疾患の他の遺伝的素因を明らかにするための必須のプロセスであり、真の疾患原因探索のためにもこの次世代シーケンシングの新たなプロトコールは威力を発揮するものと期待される。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol.* 2011 153(5):675-6.
- Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 128(1):223-225. e2.

- Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 2011 31(3):309-14.
 - Ohta H, Miyashita E, Hirata I, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Higashiura T, Yasumi T, Murata Y, Heike T, Yang X, Kanegane H, Ohara O, Ozono K. Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistocytosis. *Int J Hematol.* 2011 94(3):285-90.
 - Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* 2011 in press
 - Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. *Arthritis Rheum.* 2011 63(11):3625-32.
 - Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood.* 2011 118(5):1225-30.
 - Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito, MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of Base Substitution-Type Somatic Mosaicism of the *NLRP3* Gene with >99.9% Statistical Confidence by Massively Parallel Sequencing. *DNA Res.* (2012) in press
-
- 2) 学会発表**
- Ohara O. Integration of New Technologies for Accurate and Rapid Molecular Diagnosis of Primary Immunodeficiencies PEDIATRIC ACADEMIC SOCIETIES and ASIAN SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH 2011 Joint Meeting (PAS/ASPR 2011 Joint Meeting) 2011年5月1 (Denver, Colorado)
 - 小原 收 原発性免疫不全症研究の基盤整備 遺伝医学合同学術集会2011 2011年6月 (京都)
 - 釜江智佳子、本間健一、野々山恵章、今井耕輔、佐藤弘樹、満生紀子、小原收 CVIDの TREC, KREC による病型分類 第5回日本免疫不全症研究会 2012年1月 (東京)
 - 小原 收 次世代シーケンシングの免疫疾患ゲノミクスにおける活用 ゲノムコンファレンス 2011年6月 (東京)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群の迅速鑑別診断に向けた尿中メバロン酸測定系の開発に関する研究

研究分担者：重松 陽介
(福井大学医学部看護学科健康科学教授)

研究要旨

高 IgD 症候群 (HIDS) は、コレステロール合成に重要なメバロン酸キナーゼをコードする遺伝子に変異があり、尿中のメバロン酸 (MVA) 排泄量が軽度上昇するメバロン酸キナーゼ欠損症の軽症型病型とされている。一昨年度の研究で開発し、昨年度更に改良した尿中 MVA 分析法を用い、HIDS 疑い例の化学診断などに対応した。平成 23 年度に尿中 MVA を分析した HIDS 疑い例は 17 例であり、昨年度よりやや増加した。尿中 MVA は $0.136\sim 0.703$ $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ (mean \pm SD : 0.243 ± 0.129) と、前年度までの非患者群での値と同等であり、患者ではないと判定された。本年度の HIDS 患者 1 例の追跡分析では $17.3\sim 48.2$ $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ であり、本法の診断精度に問題はないと考えられた。本法は簡便かつ精度の保たれた分析法であり、HIDS のハイリスク・スクリーニング法として有用であった。

A. 研究目的

高 IgD 症候群 (HIDS) は、コレステロール合成に重要な酵素であるメバロン酸キナーゼをコードする遺伝子の変異が原因であり、尿中のメバロン酸 (MVA) 排泄量が軽度上昇しているとされている。先天代謝異常症として知られ進行性の中樞神経障害を呈する“メバロン酸血症”とは臨床症状およびその重症度が明らかに異なり、尿中 MVA 排泄量もメバロン酸血症の方が遙かに多い。

昨年度までの研究では、既報のガスクロマト質量分析 (GC/MS) 法による MVA 測定法に改良を加え、疑い例のスクリーニング検査法として有用であるか検討するとともに、既診断患者の経過や治療効果判定に利用できるかどうかについても検討した。本年度は、この方法で本症疑い例のスクリーニング検査を継続した。

B. 研究方法

試料調製は、これまでと同様の手順で行い、MVA のラクトン体であるメバロノラクトンを TMS 誘導体化した。

GC/MS 分析も、昨年度と同様に、Thermo-Fisher 社製 DSQ ガスクロマト質量分析計システムを使用し、GC の昇温プログラムは複数採用して分析した。

C. 研究結果

本年度に分析対象とした HIDS 疑い患者 17 例であり、尿中 MVA 排泄量は $0.136 \sim 0.61 \mu\text{g}/\text{mgCr}$ (mean \pm SD : 0.243 ± 0.129) であった (前年度までの値は、 $0.072 \sim 0.61 \mu\text{g}/\text{mgCr}$, mean \pm SD : 0.189 ± 0.116)。HIDS 患者 1 例において、診断後の治療経過として尿中 MVA をモニターしたところ、

$17.3 \sim 48.2 \mu\text{g}/\text{mgCr}$ であった。

D. 考察

本年度の HIDS 疑い例 17 例の尿中 MVA 排泄量は、前年度までの非患者対照値と有意差はなく同等であり、また患者での排泄量域から比べても低い値であったので、患者ではないと判断した。本年度測定した既診断 HIDS 患者の MVA 排泄量は、患者での排泄量域に上昇しており、本法のスクリーニング精度が確認された。

本法は、内部標準として使用している ^{13}C 標識メバロノラクトンの特性上分析濃度域が限定されるという制約があるが、ハイリスク・スクリーニング法としては実用上問題なく HIDS 患者の化学診断法として有用であり、更に HIDS 疑い例での分析が進められるべきと考えられた。

E. 結論

GC/MS により尿中 MVA 排泄量を定量する本法は、簡便かつ精度の保たれた分析法であり、本症候群のスクリーニング法として充分活用できることが示された。

F. 研究発表

1) 論文発表

- 1) Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H: Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* 2011 Dec 11. [Epub]
- 2) Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A,

Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J: Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. Mod Rheumatol. 2011 Mar 12. [Epub].

- 3) 重松陽介、畑郁江、稲岡一孝：タンデムマススクリーニングにおける標準的
非誘導体化分析法. 日本マススクリー
ニング学会誌. 21(3) ; 207-212, 2011.

2) 学会発表

1. Y Shigematsu, I Hata, G Tajima:
Evaluation of fatty acid oxidation defects
using lymphocytes loaded with stable-
isotope labeled fatty acid. Annual
Symposium of the Society for the Study of
Inborn Errors of Metabolism. 2011,9.
Geneva, Switzerland.
2. 重松陽介：タンデムマスを導入した新
しい新生児マススクリーニング タンデ
ムマス・スクリーニングの実際とピッ
トフォール. 第 114 回日本小児科学会
学術集会. 2011, 8. 東京.

G：知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし